《化学品 稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验》
编制说明
（征求意见稿）

《化学品 稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验》团体标准编制组

二〇二一年九月

项目名称：化学品 稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验

项目统一编号：SHSOT-2020-B03

承担单位：上海市检测中心等。

编制组主要成员：刘亚楠、陈晓倩、张瑛等

《化学品 稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验》团体标准编制说明

一、 目的和意义

本标准规定了化学品稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验的方法，方法适用于测试化学品对稀有鮈鲫胚胎的急性毒性。

全球化学品大约有 700 万种化学物质，其中常用化学物质超过 7 万种，并且每年还有 1,000 多种新的化学物质问世。中国现有化学物质大约有 45,000 种，每年申报新化学物质约 1000 多种。化学品是现代社会不可缺少的生产资料和消费品。但是，许多化学品对人类和环境有不同程度的危害，由于误用、滥用、化学事故或处理处置不当，会对人类健康和生态环境产生不利影响。

通过标准化的生态毒性检测对化学品进行危害鉴别并实施安全管理是当今国际上大趋势。2000 年以来，联合国的 GHS 体系、欧盟的 REACH 以及 CLP 等一系列法规和技术方法都推动了化学品安全管理的全球化。鱼类作为水生生态毒性试验体系中的顶级脊椎动物，在化学品生态毒性试验体系中有着不可替代的作用。因此，发达国家早在化学品安全管理体系建立之初，就通过大量标准化研究推出符合管理要求、具有科学基础的代表性试验鱼种。国际标准化组织（ISO）在上世纪 80 年代即推荐斑马鱼（*Danio rerio*）、黑头软口鲦（*Pimephalespromelas*）、蓝鳃鱼（*Lepomismacrochirus*）、虹鳟（*Oncorhynchus mykiss*）和青鳉（*Oryziaslatipes*）等鱼种作为为毒性试验材料鱼。在经济合作与发展组织（OECD）化学品测试指南中，有多个鱼类测试的方法。这些标准化工作为发达国家在化学品安全管理全球化的过程中争得了绝对的主导权，并将管理体系和标准化技术的优势延伸扩大到化学品生产、国际贸易等经济活动方面。

我国实施国际公认的化学品安全管理虽然比欧美要晚了数十年，但起步阶段就明确提出：生态毒理学特性测试报告，必须包括在中国境内用中国的供试生物按照相关标准的规定完成的测试数据。目的是为了保证我国的生态环境安全。采用中国的本土鱼种，遵从国际通行的标准化原则和过程，制定适用于国际公认的化学品安全管理的鱼类毒性技术标准是本标准的特点。因此，本标准不是等同转化国外同类标准。标准的制定对我国化学品安全管理及支撑技术体系是一件意

义重大、影响深远的开拓性工作。

稀有鮈鲫（*Gobiocypris rarus*）作为中国土著试验鱼种在保护我国特定生态环境、完善我国化学品安全管理及实施中国国家标准化战略中具有特殊意义，与之相关的急性毒性和慢性毒性试验国家标准已陆续颁布。在 OECD 化学品测试方法中，由于鱼类在水生生态系统中的关键地位，鱼类毒性测试占有重要地位，从生态毒性层面分析，就包括胚胎、仔鱼、幼鱼、成鱼全生命周期的试验标准。为持续推进稀有鮈鲫标准化，有必要在目前已有研究基础上，拓展稀有鮈鲫生态毒性测试标准。胚胎急性毒性试验作为 OECD 生态毒性系列标准中较新颁布的试验方法，具有成为成鱼急性毒性试验潜在替代方法。胚胎作为鱼类生命的最初期，对化学品的敏感性通常优于其它阶段，建立与此相关的国家标准，对构建稀有鮈鲫毒性试验标准体系的框架有实质性拓展。标准编制拟参考国际标准制定原则，结合稀有鮈鲫胚胎特征，对胚胎毒性试验的一些关键点进行研究。在此基础上制定化学品稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验标准。该标准不仅能够提升我国化学品安全管理的水准，紧跟国际热点和趋势，同时切实落实管理上要求的用中国特有的供试生物进行测试，而且扩大了稀有鮈鲫作为试验生物的使用范围，便于累积更多的基础数据。从而推动我国标准化战略从遵从国际标准向兼容并蓄中国自主标准的方向转化。

二、 标准的国内外背景

1、中国国内化学品安全管理的要求及短板

2003 年 9 月 13 日颁布的我国“新化学物质环境管理办法”第八条规定“新化学物质的生态毒理学数据必须包括在中国境内用中国的供试生物完成的测试数据。”这从行政管理上奠定了保护我国生态环境安全的基础，也为后续生态毒性测试技术标准化的突破预留了空间。

稀有鮈鲫（*Gobiocypris rarus*）是我国特有的一种小型鲤科鱼类。因其性成熟时间短，繁殖季节长，产卵量较大，可常年人工繁殖，具有成为标准实验鱼种的潜能。其生物学特征研究较为系统，国内已有多家单位使用稀有鮈鲫开展科学研究，这些工作涉及鱼病学、遗传学、环境科学、胚胎学、生理生态学等领域。尽管在化学品测试和安全性评价、测试现场样品和污染指标、监测持久性污染物和内分泌干扰物等方面也有应用，但是迄今为止，有关稀有鮈鲫的研究大多是将

稀有鮈鲫作为科学研究的材料，尚未见标准化方面的报道。生态毒理学应用研究较少，尤其在标准化基础研究方面。主要表现在以下几个方面：1）稀有鮈鲫对不同化学品的敏感性研究；2）稀有鮈鲫在实验室内和实验室间的测试结果稳定性；3）稀有鮈鲫与现有国际标准种的生态毒性响应关系；4）规范化的饲养、维持和疾病预防。

为解决上述标准化过程中的短板，实验室在多年应用稀有鮈鲫进行毒性实验的基础上于 2016 年启动了为期两年的标准化专项研究，并延续一年补充数据基础和完成实验室间的比对验证。

2、国际化学品安全管理体系的压力和推力

国际化学品安全管理是建立在数据基础上的物质危害分类和风险评估两阶段体系。数据是基础，测试方法是载体。经济合作与发展组织（由发达国家组成的组织，目前有三十多个成员国，总部设在巴黎，以下简写为“OECD”）在 1981 年发布了《化学品测试指南》系列技术指南文件（简称 OECD-TGD），指导各成员国按统一的方法进行测试。目前全球化学品测试体系基本上以 OECD-TGD 为框架。从测试方法到生物物种，欧美占了绝对的主导地位。生态保护上的特异性是全球公认的，我们需要有符合我国环境保护特点的试验鱼种。但落实这个目标也带来了很大的技术压力，如 OECD-TGD 中的测试物种、基质等要素都是在美国、欧洲的研究基础上提出来的。对保护我国生态环境安全没有针对性。虽然，我国的新化学物质提出用中国境内的受试生物进行生态毒性试验，欧美对此原则上不持异议，但一直有操作层面上的质疑，认为如果用中国境内的国际标准鱼种（如斑马鱼、青鳉等），就有重复试验的嫌疑。在化学品安全管理体系的数据支撑部分，我们提出了在国际上不受质疑的环境保护基本原则，但在具体如何实施上备受质疑。

与此同时，随着欧盟 REACH 法规出台、美国 TSCA 法规的改革，国际上越来越认同需要全新的测试策略来完善化学品的测试方案。从科学角度，化学品测试方案的设计应该获得最大的生态关联。虽然，这常常受制于资源。所以，有必要发展科学的试验策略避免不必要的动物实验，降低费用，缩短试验时间。近两年来，欧美大力推进试验策略构建，其中如何选择有代表性试验生物以及生态毒性数据必须考虑区域生态相关性被列为需要优先考虑的问题。这就是欧美原则

上不反对我国管理体系中要求用中国境内的供试生物的原因，从客观上，国际上的这种观点也对我们目前进行的本土生物标准化研究形成了一种推力。

三、项目的标准化研究结果

1.稀有鮈鲫胚胎标准化研究总体框架

参考《OECD 化学品测试指南》，对稀有鮈鲫作为鱼类胚胎急性毒性试验鱼种的试验条件进行优化和标准化；选取 9 种不同种类的化学品，评价稀有鮈鲫胚胎对化学品的敏感性；进行实验室内及 6 个国内不同地域的实验室进行比对试验，评价试验方法的重复性和再现性；通过与国际通用鱼种斑马鱼之间的比对，建立新鱼种和现行国际公认标准鱼种的相互关系，验证毒性数据的可比性。主要内容如下：

1）稀有鮈鲫作为试验鱼种的生物学适宜性研究

通过稀有鮈鲫和斑马鱼生物学特征的比较，并参阅文献分析稀有鮈鲫作为胚胎急性毒性试验鱼种的生物学可行性，在此基础上提出符合国际规范的标准化试验方法。

2）稀有鮈鲫作为试验鱼种的敏感性、重复性和再现性研究

选择 9 种不同种类的化学品，参考《OECD 化学品测试指南》和《化学品测试方法》进行稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验，通过实验和已有文献资料相结合的方式，分别将稀有鮈鲫胚胎与斑马鱼胚胎，稀有鮈鲫胚胎与其成鱼进行比较，研究稀有鮈鲫胚胎的敏感性。选择国际上常用的 2 种参比物，进行多次实验室内和实验室间的鱼类胚胎急性毒性试验，评价稀有鮈鲫胚胎对化学品重复性和再现性。

3）稀有鮈鲫与现行标准鱼种-斑马鱼试验结果的可比性研究

选择其中 2 种化学品对稀有鮈鲫胚胎和斑马鱼胚胎进行比对试验；同时将 2 种参比物与国际上通用鱼种数据（US EPA ECOTOX data base）进行比对，建立相互关系，验证毒性数据的可比性。

2.稀有鮈鲫标准化研究解决的问题

1）稀有鮈鲫饲养规范标准化

稀有鮈鲫作为中国土著鱼种，在生态毒性试验中有着其特有的生物学适宜性。

但由于其生态分布的特异性，在其成为中国的标准试验鱼种的过程中，需要实验室大规模人工繁殖及引入规范的质量控制。研究借鉴了国外和其它实验动物的饲养经验，初步建立了稀有鮈鲫的规范化饲养。

2）鱼类胚胎急性毒性试验方法的标准化

急性毒性试验在国家化学品安全管理体系中属于最基础的数据要求等特点，成为生态毒性试验中应用频次最高的一种方法。对试验条件选择、健康状况、暴露条件等因素进行优化及标准化。

3.研究结果

1）稀有鮈鲫作为试验鱼种的生物学适宜性研究

稀有鮈鲫主要分布在长江上游，属温水性鱼类，卵生。成体大小 40-83 mm TL，世代周期 3-4 个月。产卵时间一般在 18:00 至 24:00，产卵量几十到上千粒，平均 300 粒，连续产卵，产卵间隔 3-4 天。卵膜透明，具有粘性，卵膜径 1.25-1.70mm，受精率 80%左右，25℃下孵化周期为 75h。耐温范围 0-36℃，养殖水体硬度 0-480。

斑马鱼主要分布在印度东部、巴基斯坦、缅甸、孟加拉国等地区，属热带鱼类，卵生。成体大小 45 mm TL 左右，世代周期 3 个月左右。黎明时分产卵，产卵量 150-400 粒，连续产卵，产卵间隔 5-10 天。卵膜透明，无粘性，卵膜径 0.92-0.98 mm，受精率大于 80%，28.5℃下孵化周期为 48h。耐温范围 6.7-41.7℃，养殖水体硬度大于 100。

稀有鮈鲫作为一种新的实验鱼种具有以下优点：(1)个体小，饲养方便；(2)性成熟周期短；(3)控温条件下可以实现周年繁殖；(4)可连续产卵，短期内可获得同一亲本的大量后代，对于单个试验而言，同一来源的大批量受精卵可满足统计学意义上的各类分析；(5)卵粘性，较斑马鱼、青鳉卵大。卵膜透明，可清楚地观察胚胎发育；(6)胚胎发育温度适应范围广；(7)对温度、二氧化碳、溶解氧的耐受能力强；(8)运用一定的标记技术，可透过细胞膜，准确地观察某个基因在组织器官或个体中的表达。

在生态毒理学领域，实验证实了稀有鮈鲫胚胎对重金属、农药等化学品比较敏感，是进行化学品毒性测试的理想材料。稀有鮈鲫作为中国的土著鱼种，在生态毒性试验中有着其特有的生物学适宜性。

2）稀有鮈鲫作为试验鱼种的重复性、敏感性和再现性研究以及与现行国际标准鱼种试验结果的可比性

研究优化筛选了两种国际常用的为参比物质（3,4-二氯苯胺和五水硫酸铜），参考《OECD 化学品测试准则 No.236 鱼类胚胎急性毒性试验》，分别开展 6 次稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验，评价试验结果的稳定性和重复性。6 次重复试验结果显示，3,4-二氯苯胺的 96h LC_{50} 平均值（$\bar{x}$）为 12.8mg/L，标准差（s）为 1.70mg/L，变异系数（CV）为 13.3%；五水硫酸铜的 96h LC_{50} 平均值（$\bar{x}$）为 1.76mg/L，标准差（s）为 0.197mg/L，变异系数（CV）为 11.2%。两种参比物 6 次重复试验的 96h LC_{50} 值均在各自 $\bar{x}$±2s 范围内；CV 均小于 30%。参考 OECD 斑马鱼胚胎急性毒性试验验证报告，3,4-二氯苯胺实验室内重复试验的 CV 范围为 5.50～22.4%；五水硫酸铜实验室内重复试验的 CV 范围为 7.24%～14.9%，可见稀有鮈鲫两种参比物重复试验的 CV 均处于中位数。上述结果均表明，稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验有良好的稳定性和重复性。

研究选取 9 种不同种类的化学品开展稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验，通过实验和已有文献资料相结合的方式，分别将稀有鮈鲫胚胎与斑马鱼胚胎，稀有鮈鲫胚胎与其成鱼进行比较，研究稀有鮈鲫胚胎的敏感性和可比性。将 9 种化学品对稀有鮈鲫和斑马鱼胚胎的 96h LC_{50} 进行比较发现，对于七水硫酸锌（ZSH）、三甘醇（TEG）和重铬酸钾（PD），稀有鮈鲫 96h LC_{50} 值均低于斑马鱼，敏感性优于斑马鱼。其中，ZSH 对稀有鮈鲫胚胎的 96h LC_{50} 值为 10.4mg/L，斑马鱼为 238mg/L，两者差异约 22.9 倍，可见稀有鮈鲫胚胎对 ZSH 异常敏感。此外，3,4-二氯苯胺（3,4-DCA）、五水硫酸铜（CSP）、2,3,6-三甲基苯酚（2,3,6-TMP）、二甲基亚砜（DMSO）、氯化钠（SC）和十二烷基硫酸钠（SDS）对稀有鮈鲫胚胎的 96h LC_{50} 值均略高于斑马鱼，但均未超过一个数量级，在 1.31～6.05 倍之间；其中，2,3,6-TMP 和 DMSO 对稀有鮈鲫胚胎 96h LC_{50} 值分别为 14.1mg/L 和 51.7g/L，斑马鱼胚胎为 10.8mg/L 和 34.1g/L，两者绝对值接近，敏感性类似。鉴于生物物种间的差异，稀有鮈鲫胚胎的敏感性不亚于斑马鱼胚胎，适宜鱼类胚胎急性毒性试验的应用。将 9 种化学品对稀有鮈鲫胚胎和成鱼的 96h LC_{50} 值进行比较发现，对于 2,3,6-TMP， ZSH 和 TEG，稀有鮈鲫胚胎 96h LC_{50} 值均低于成鱼，敏感性优于稀有鮈鲫成鱼。对于 3,4-DCA、CSP、DMSO、SC、SDS 和 PD，稀有鮈鲫胚

胎 96h LC_{50} 值均略高于成鱼，差异在 1.13～4.60 倍之间，均未超过一个数量级。其中，3,4-DCA、CSP 和 SC 对稀有鮈鲫胚胎 96h LC_{50} 值分别为 12.8mg/L、1.76mg/L 和 10.4g/L；成鱼 96h LC_{50} 值分别为 6.59mg/L、1.29mg/L 和 9.188g/L，两者绝对值接近，胚胎与成鱼的敏感性类似。由此可见，稀有鮈鲫胚胎与其成鱼相比，敏感性类似，具有成为成鱼急性毒性试验替代方法的应用潜力。

选择 3, 4-二氯苯胺和五水硫酸铜作为参比物质，按照《OECD 化学品测试准则 No. 236 鱼类胚胎急性毒性试验》，进行 6 家实验室间比对试验以评价试验结果的再现性。实验室间比对试验中，3, 4-二氯苯胺和五水硫酸铜对稀有鮈鲫胚胎急性毒性 96 h 半数致死浓度（LC_{50}）的总体平均值和标准差分别为（9.25 ± 3.62） mg/L 和（1.63 ± 0.59）mg/L，变异系数分别为 39.1%和 36.0%。采用 z 分数方法评价各实验室间比对试验结果的差异大小，各实验室 3, 4-二氯苯胺和五水硫酸铜比对结果的 z 分数分别在-1.42 ~ 1.23 之间和-0.898 ~ 1.56 之间。虽然变异系数较大，但各实验室的 96 h LC_{50} 均在（xpt± 2σpt）范围之内。稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验结果具有良好的再现性，且稀有鮈鲫胚胎对 3, 4-二氯苯胺和无水硫酸铜的敏感性和斑马鱼（*Danio rerio*）胚胎大致接近，因此稀有鮈鲫可作为鱼类胚胎急性毒性试验的本土受试鱼种。

4. 稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验标准化过程中关键问题的总结

1）稀有鮈鲫适宜作为标准鱼种能够满足易于饲养、试验方便等方面的要求。作为中国土著鱼种，是进行化学品毒性测试的理想材料。

2）稀有鮈鲫胚胎毒性试验结果无论在实验室内还是在实验室间都具有较好的稳定性和重复性。研究使用的两种化学物质数据的质控限，可作为参比物，建立实验室内部的急性毒性试验质控图。

3）稀有鮈鲫胚胎对多种化学品的敏感性均不亚于其它试验鱼种，对有机污染物尤为敏感。

四、标准的任务来源

2020 年 6 月上海市毒理学会下达《化学品稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验》的编制任务，归口单位上海市毒理学会标准化技术委员会（计划编号为

SHSOT-2020-B03），标准由上海市检测中心负责起草，参加单位有：中国科学院水生生物研究所、沈阳化工研究院有限公司安全评价中心、宁波检验检疫科学技术研究院、苏州华测安评技术服务有限公司、贵州健安德科技有限公司。

五、主要编制过程

本团体标准在上海市毒理学会标准化技术委员会批准立项前后，主要工作如下：

1. 标准前期研究工作。

1）主要对已有国内外相关标准的比较和分析，确定各个相关试验的具体计划。包括稀有鮈鲫胚胎发育的研究、受试化学品的选择和基础资料的收集等。同时，联系与落实各比对实验室准备比对试验。

2）2017 年 5 月-2020 年 4 月，完成了由上海市科学技术委员会资助的技术标准专项（科委项目编号 17ZR1424400）——《中国模式鱼种稀有鮈鲫在替代试验中的验证研究》，并最终提交了稀有鮈鲫胚胎作为急性毒性试验试验生物的验证报告一篇，报告首次系统性地研究了稀有鮈鲫胚胎作为试验用鱼的标准化研究。项目完成了任务书规定的各项考核指标，并一致通过验收专家组的验收，同时建议项目组在推动国内对本土试验生物的系统性研究上有进一步突破。

2. 2020 年 6 月-8 月，初步确立了标准的框架结构、主要内容和后续试验方案，对标准起草和验证研究进行了部署和安排。

3. 2020 年 9 月-11 月，资料文献的调研与查阅。查阅了欧盟和 OECD 化学品测试方法及其它国外有关标准中关于此类试验的规定及相关技术研究报告，调研了国内化学品鱼类胚胎急性毒性试验的实际使用情况。

4. 2018 年 1 月-2021 年 6 月，对化学品鱼类胚胎急性毒性试验的设施设备、试验材料、试验条件和试验操作等进行了研究，结合已往的实践经验，起草了符合我国国情并与国际标准方法相符的标准草稿；各比对单位完成了参比物及不同化合物的比对试验。

六、标准的主要内容

4.1 本标准规定了化学品稀有鮈鲫胚胎急性毒性试验的方法，包括静态试验、半静态试验和流水式试验三种方式，受试物必备信息、原理、设备与材料、试验系统、试验程序、质量控制、结果报告和附录 A。

4.2 本国家标准参考了 OECD Guidelines For Testing Of Chemicals, 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.《化学品鱼类胚胎急性毒性试验》（英文版）有关鱼类胚胎毒性试验的基本框架，综合国内基础研究和标准化前期研究结果和经验，进行了实质性结构、内容的补充，具体如下：

——规定了标准试验鱼种仅特指稀有鮈鲫胚胎；

——增加了关于不同类型试验方式选择的判断依据；

——增加了稀有鮈鲫的选择标准和驯养条件；

——增加了不同试验方式对于化学分析频率的要求，

——补充了试验体系下受试物饱和溶液限度试验的内容。

七、说明

5.1 本团体标准主要内容、格式、术语等依照 GB/T1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》和 GB/T 1.2-2020《标准化工作导则第 2 部分：以 ISO/IEC 标准化文件为基础的标准化文件起草规则》要求编写。

5.2 本团体标准中的术语与定义来源于《OECD Guidelines For Testing Of Chemicals, 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test》（英文版）中术语与定义的内容。

5.3 本团体标准参考了 OECD Guidelines For Testing Of Chemicals, 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.《化学品鱼类胚胎急性毒性试验》（英文版）。